

Title	Progress in Simultaneous Measurement of Structural and Functional Changes of Ion-Channel Proteins
Author(s)	平野, 美奈子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57730
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"> 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 83 】	
氏 名	平 野 美 奈 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 9 3 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	Progress in Simultaneous Measurement of Structural and Functional Changes of Ion-Channel Proteins (1 分子構造・機能同時計測によるイオンチャネルの開閉機構に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 柳 田 敏 雄 (副査) 教 授 河 村 悟 教 授 平 岡 泰

論文内容の要旨

イオンチャネルは生体膜に存在し、細胞内外のイオン環境を調節することにより細胞の生理機能を制御するタンパク質である。その機能はパッチクランプ法や平面脂質膜法などの電気的計測装置により古くから1分子レベルでリアルタイムで調べられ、様々なチャネルの機能が解明されてきた。また、この十数年の間にチャネルの構造に関する研究が急速に進み、いくつかのチャネルの結晶構造が解かれ、NMRやEPRなどの構造解析からも構造が予測されている。このようにチャネルに関する機能と構造の情報が多く得られてきたことから、生体のイオンチャネルの構造と機能の関係、つまりチャネル開閉(ゲーティング)機構の解明が期待されている。我々のグループでは、構造－機能相関を明らかにするため、1分子レベルでのチャネルの機能変化と構造変化の同時測定を試みている。そのため、本研究では以下の2点を目的とした。

- ①単一チャネルの光学的・電気的同時計測装置を開発すること
- ②KcsAチャネルの開閉に伴う構造変化を蛍光強度の変化として捉えること

＜①同時計測系の開発＞

我々が以前開発した光学的・電気的同時計測装置でイオンチャネルの1分子同時計測が可能になったが、イオンチャネルの脂質二重層膜への組み込み効率が低い、チャネルが二重膜中を動き回るため正確な構造変化のデータを得られないなどのいくつかの問題があった。そこで、これらの問題点を解消したより簡便な2つの新しい人工膜作製法を開発した。1つ目の方法は、ハイドロゲルとハイドロゲルで脂質溶液を挟み込むことによって脂質二重層膜を作製する方法である。従来法ではゲル / 溶液界面に脂質二重層膜が自然に形成されるのを待ったが、ゲル同士で脂質溶液を挟むことによって迅速に脂質二重層膜を形成することができ、イオンチャネルの組み込みも促進された。2つ目は、コバルトアフィニティーゲルビーズにHisタグ付きのチャネルタンパク質を固定し、そのビーズ上に脂質二重層膜を作製する方法である。この方法は、チャネルがビーズに固定することができる上、従来法に比べて脂質二重層膜への組み込み確率が高かった。

＜②KcsAチャネルの構造変化＞

ゲーティングに伴うチャネルの構造変化を光学的に捉えるには、チャネルに標識した蛍光分子の蛍光変化として捉える必要がある。本研究では、細菌のK⁺選択性イオンチャネルであるKcsAチャネルの構造変化を蛍光強度の変化として捉えた。蛍光分子テトラメチルローダミン(TMR)で特異的に標識されたKcsAチャネルの蛍光強度をチャネルゲート活性化(pH4)と不活性化条件下(pH7)で測定した。TMRは疎水性環境下では蛍光強度が高く、親水性環境下ではその強度が低いことが知られており、蛍光強度変化から蛍光分子の環境変化、即ちタンパクの構造変化が検出される。その結果、膜貫通領域のC末端とそれに続く細胞内領域の一部において、活性化(開)状態(pH4)では蛍光強度が高く、不活性化(閉)状態(pH7)では低いことが分かった。このことから、これらの領域は活性化(開)状態では疎水性の環境下に存在し、不活性化(閉)状態では親水性環境下に存在すると考えられる。また、pH4での高い蛍光は、膜局在消光剤(DPA)によって消光されたことから、これらの領域はチャネルの活性化に伴って膜に向かって移動することが示された。

これらの結果をもとに、今後新たな光学的・電気的同時計測装置を用い、KcsAの膜貫通領域のC末端とそれに続く細胞内領域の一部の構造変化を蛍光強度の変化として機能変化とともに測定し、KcsAの開閉のメカニズムを明らかにしたいと考えている。

論文審査の結果の要旨

イオンチャネルは細胞内外のイオン環境を調節することにより細胞の生理機能を制御する重要なたんぱく質である。イオンチャネルの機能については電気生理学的手法により古くから1分子レベルで詳細に調べられてきたが、その開閉機構は未だ完全に明らかにされていない。その

大きな要因の一つはチャネルの構造変化と機能変化を対応させることができていないことにあ

る。本論文において申請者は、カリウムチャネルの一つであるKcsAチャネルの開閉機構を明らか

にすることを目的とした。まず、申請者は蛍光分子を用いることにより、KcsAチャネルの細胞内領

域が開閉に伴って大きく構造変化することを光学的に明らかにした。このKcsAチャネルの構造変

化は世界で初めて明らかにした活性の制御に関わる変化である。また、この構造変化がどのよう

に機能と関連しているのかを調べるため、従来の構造変化と機能変化を同時に捉えることができ

る光学的・電気的同時計測装置を改良し、簡便な系を開発した。これにより、1分子レベルで

KcsAチャネルの構造変化と機能変化を光学的・電気的に同時測定できる系が確立できた。本

研究成果は今後のチャネルの1分子の光学的・電気的同時計測に大きな寄与を果たし、博士

(理学)の学位に値するものと認める。